

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-503232

(43) 公表日 平成9年(1997)3月31日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 K 7/08	Z N A	8517-4H	C 0 7 K 7/08 Z N A
A 6 1 K 38/00	A B A	8517-4H	14/715
C 0 7 K 14/715		9051-4C	A 6 1 K 48/00
// A 6 1 K 48/00		9637-4B	C 1 2 P 21/02 K
C 1 2 N 15/09		9051-4C	A 6 1 K 37/02 A B A
審査請求 有 予備審査請求 未請求(全 22 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平8-517466
 (86) (22) 出願日 平成7年(1995)12月5日
 (85) 翻訳文提出日 平成8年(1996)7月25日
 (86) 国際出願番号 PCT/IT95/00208
 (87) 国際公開番号 WO96/17869
 (87) 国際公開日 平成8年(1996)6月13日
 (31) 優先権主張番号 RM94A000794
 (32) 優先日 1994年12月6日
 (33) 優先権主張国 イタリア (I T)
 (81) 指定国 EP (A T, B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), A U, C A, C N, J P, U S

(71) 出願人 イスチチュート デイ リセルシュ デイ
 バイオロギア モレコラレ ビー. アン
 ジェレッティ ソシエタ ベル アチオニ
 イタリア国 アイ-00040 ポメジア, ビ
 ア ポンティナ ケイエム. 30. 600
 (72) 発明者 シリベルト, ゲンナロ
 イタリア国 アイ-00124 カサルパロッ
 コ, ビアル ゴルジア ディ レオンティ
 ニ 330/19
 (72) 発明者 トニアッティ, カルロ
 イタリア国 アイ - 00142 ローマ,
 ビア ベネデット クロセ 26
 (74) 代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

(54) 【発明の名称】 GP130結合界面で突然変異したインターロイキン-6 (IL-6) 受容体 α の可溶性型である
 IL-6アンタゴニスト

(57) 【要約】

これらは、gp130界面に1つまたはそれ以上の突然変異を有するヒトIL-6の受容体 α の可溶性型 (shIL-6R α) よりなることを特徴とする、インターロイキン-6のアンタゴニストである。好適な実施態様において、突然変異は、Ala228、Asn230、His280、およびAsp281よりなる群から選択される位置に存在する。これらのアンタゴニストは、異常IL-6活性に引き起こされる疾患を予防および治療することができる薬剤として使用することができる。図4は、野性型shIL-6R α のアゴニスト性と比較した、突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Valのアンタゴニスト活性を示す。このアンタゴニストは、異常IL-6生物活性に引き起こされる疾患を予防、制御および治療するための薬剤の調製に使用することができる。

野性型 配列番号: 4
 shIL-6R α (100 nM) — — — — + + + + + +
 hIL-6 (pM) — 2 20 200 2 20 200 2 20 200

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

第 4 図

【特許請求の範囲】

1. gp130と結合する界面に1つまたはそれ以上の突然変異を有するIL-6の α 受容体の可溶性型(sIL-6R α)であることを特徴とするインターロイキン-6(IL-6)のアンタゴニスト。
2. sIL-6R α は、Ala228、Asn230、His280、およびAsp281よりなる群から選択される位置に少なくとも1つの突然変異を有する、請求の範囲第1項記載のインターロイキン-6のアンタゴニスト。
3. sIL-6R α は突然変異体Asn230Asp(配列番号：1)を有する、請求の範囲第1項又は第2項記載のインターロイキン-6のアンタゴニスト。
4. sIL-6R α は突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp(配列番号：2)を有する、請求の範囲第1項又は第2項記載のインターロイキン-6のアンタゴニスト。
5. sIL-6R α は突然変異体His280Ser/Asp281Val(配列番号：3)を有する、請求の範囲第1項又は第2項記載のインターロイキン-6のアンタゴニスト。
6. sIL-6R α は突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val(配列番号：4)を有する、請求の範囲第1項又は第2項記載のインターロイキン-6のアンタゴニスト。
7. 異常IL-6活性により引き起こされる疾患を制御、予防および治療することができる薬剤の研究と調製のための、請求の範囲第1から第6項までに記載のインターロイキン6アンタゴニストの使用。
8. 前述し、例示し、特許請求した、IL-6アンタゴニストとして作用する可溶性受容体およびその使用。

【発明の詳細な説明】

GP130結合界面で突然変異したインターロイキン-6 (IL-6) 受容体 α の可溶性型であるIL-6アンタゴニスト

説明

本発明は免疫の分野に関する。さらに詳しくは本発明の主題は、モノマー性受容体複合体IL-6/sIL-6R α とgp130のダイマー性受容体複合体の形成を負に妨害する、インターロイキン-6の受容体 α の可溶性型の突然変異体である。本発明のさらなる主題は、異常なIL-6活性により引き起こされる疾患を制御、予防及び治療するためのインターロイキン-6アンタゴニストとしてのこれらの突然変異体の使用である。

本発明において「インターロイキン-6」又は「IL-6」という用語は、IL-6、及び野生型IL-6の生物学的特徴を維持しているその断片、欠失体、挿入体、置換体、突然変異体及び修飾体を意味する。他に特に明記していない場合は、この用語はヒトIL-6を意味する。

インターロイキン-6は、異なる標的細胞の種々の生物学的応答を誘発する。しかしIL-6の生理学的産生はB細胞増殖と成熟を制御するが、T細胞活性化と炎症応答（サイトカインの制御されない産生）中の肝臓の急性相蛋白の産生は、多くの炎症性、自己免疫性及び新生物性疾患の病原性に決定的に重要な役割を果たす。

現状の技術水準から判断されるように、単一の疾患の発生におけるIL-6の果たす役割を研究し、治療用の薬剤を規定するために、IL-6生物活性阻害剤を極めるための種々の試みが行われている。

また成熟なヒトIL-6蛋白(hIL-6)は、2つのジスルフィド結合(Cys45~Cys51、及びCys74~Cys84)を有する185個のアミノ酸のポリペプチドであることも公知である。IL-6は、標的細胞表面上の少なくとも2つの特異的受容体(IL-R α とgp130)との2つの結合部位(部位Iと部位IIとして知られている)と相互作用し、3量体複合体であるI

L-6-(受容体)₂を形成することにより機能する。この複合体は以下のよう

に順に形成される。第1の受容体 (IL-6R α) が、シグナルを伝達することなく IL-6 の部位 I に低親和力で結合し、次に第2の受容体 (gp130) が高親和力で IL-6 の部位 II に結合した後シグナルを伝達する。

この機序に基づき、第1の受容体を部位 I に結合させることはできるが、突然変異により第2の受容体が部位 II に結合するのを立体的に阻害する受容体が2量体化することができなくする h IL-6 突然変異体が設計された。この型の突然変異体は WO 94/09138 (シータス・オンコロジー社 (Cetus Oncology Corporation))、及び WO 94/011402 及び PCT/IT 94/00095 (インスチット・ジ・リセルシェ・ジ・ビオロギア・モレコラレ・ピー・アンゲレッチ社 (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P. Angeletti S.p.A.)) に記載されている。

gp130 との界面領域に1つまたはそれ以上の突然変異を有する IL-6 の受容体 α の可溶性型 (s IL-6R α) はインターロイキン-6 のアンタゴニストであることが発見され、この発見が本発明の基礎となっている。

1つの実施態様において、s IL-6R α は、Ala 228、Asn 230、His 280、および Asp 281 から選択される位置に少なくとも1つの突然変異を有する。例えば突然変異体は、Asn 230 (配列番号: 1)、Ala 228 Asp / Asn 230 Asp (配列番号: 2)、His 280 Ser / Asp 281 Val (配列番号: 3) よりなる群から選択し得る。

好適な実施態様において、s IL-6R α は、Ala 228、Asn 230、His 280 および Asp 281 位に複数の突然変異を有する。良好な結果を与えた複数突然変異体は、Ala 228 Asp / Asn 230 Asp / His 280 Ser / Asp 281 Val (配列番号: 4) である。

IL-6 のアンタゴニスト (本発明では、gp130 に結合する界面で突然変異した、IL-6 の受容体 α の可溶性型よりなる) は、異常 IL-6 活性に関連した疾患の治療と予防に治療上有効な濃度で投与することができる。このために本発明のアンタゴニストは、静脈内又は皮下注射により投与される。これらの投与方法は当業者には公知である。

この時点まで発明を一般的に説明した。本発明の目的、特徴、利点および操作方法をさらに理解できるようにするために、以下の例により本発明をより詳細に説明する。

図1Aは、 ^{32}S で標識したs g p 1 3 0 (g p 1 3 0の可溶性型)による、本発明の突然変異体の共免疫沈降物のインビトロのSDS-PAGEゲル(12%)分析を示す。図1Bは、移動した ^{125}I -IL-6に対応するゲル上の位置を示す。

図2は、野性型s IL-6 R α 受容体と、A 3 7 5細胞の膜上のg p 1 3 0と相互作用するように突然変異したs IL-6 R α 受容体の異なる能力を、ヒストグラムの形で示す。

図3は、 ^{32}S は2.0 μg の野性型受容体又は2.0 μg の突然変異受容体(配列番号:4)で標識したs g p 1 3 0の共免疫沈降物のインビトロのSDS-PAGEゲル(12%)分析を示す。

図4は、野性型s h IL-6 R α のアゴニスト性と比較した、H e p G 2細胞上の突然変異体配列番号:4のアンタゴニスト活性を示す。

図5は、A P R FとDNA結合部位により形成された複合体(S I E、血清誘導性成分)のゲル分析を示す。(突然変異体配列番号:4は、H e p G 2細胞上のOM-依存性A P R Fの活性化を阻害しない)。

本発明のIL-6のアンタゴニストは、合成法又は組換え法を用いて産生される。後者の場合、s IL-6 R α をコードするcDNAはプラスミドに導入された後、原核生物細胞又は真核生物細胞中で発現される。細菌は好ましい原核微生物である。

あるいは本発明のs IL-6 R α 突然変異体をコードするcDNAは、哺乳動物細胞に導入することもできる。これらの哺乳動物細胞は、CHO、COS、C 1 2 7、H e p G 2、SK H e pよりなる群から選択することができる。さらに該蛋白は、公知の組換えバキュロウイルス(Baculovirus) (A c N P V株)法を用いて昆虫細胞中(S f 9又はハイファイブ(HighFive))で発現することもできる。

例 1

s I L - 6 R α 突然変異体の調製

s I L - 6 R α c D N A は、鋳型として I L - 6 R α の完全 c D N A を用いて P C R 法により 5' E c o R I - 3' X b a I 断片として得られた (スポレノ・イー、パオネッサ・ジー、サルバチ・エー・エル、グラジアニ・アール、デルマストロ・ピー、シリベルト・ジー、およびトニアッチ・シー (Sporeno E., Paonessa G., Salvati A.L., Graziani R., Delmastro P., Ciliberto G. and Toniatti C.) (1994) J. Biol. Chem. 269, 10991-10995)。3' プライマーは、6つのヒスチジンコード配列が先行するアミノ酸324位に人工的 T A G 停止コドンを導入するように設計した。これは我々が産生する s I L - 6 R α およびその突然変異体が、金属親和性クロマトグラフィーを用いて分子を精製するのに有用な、分子のカルボキシ末端に6つのヒスチジンの「尾 (tail)」を、有することを確認するために行った。次に、作成した断片を C O S - 7 細胞発現ベクター p c D N A I (インビトロゲン (Invitrogen)) 中に導入し、完全に配列決定し、こうしてプラスミド p C 6 F R H を得た。

次にプラスミド p C 6 F R H を鋳型として用いて、以下の4つの突然変異体をコードする作成体: A s n 2 3 0 A s p (配列番号: 1); A s n 2 3 0 A s p / A l a 2 2 8 A s p (配列番号: 2); H i s 2 8 0 S e r / A s p 2 8 1 V a l (配列番号: 3) および A l a 2 2 8 A s p / A s n 2 3 0 A s p / H i s 2 8 0 S e r / A s p 2 8 1 V a l (配列番号: 4) を、過去に記載されている2工程 P C R 法 (ラント・オー、グルナート・エイチ・ピー、ハーン・ユー (Landt O., Grunert H.P., and Hahn, U.) (1990) Gene 96, 125-128) により得た。

次に、この突然変異体を C O S - 7 細胞中で発現した。このために C O S - 7 細胞を、10% F C S、およびグルタミンと抗生物質を補足したダルベッコー改変イーグル培地中で5% C O₂ で維持した。蛋白発現のために、 2.5×10^6 個の C O S - 7 細胞を 100 mm 組織培養プレート中に接種し、翌日 D E A E デキストララン法 (シード・ビー、アルフォ・エー (Seed B., Aruffo A.) (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-3369) を用いて、種々の s h I L - 6 R α 発現ベクター 2 μ 9 でトランスフェクションした。トランスフ

エクシオン16時間後細胞を分け、100mmプレートに再度接種し、完全培地中で37℃で増殖させた。72～96時間後培地を集め、遠心分離し、共免疫沈降実験および結合測定法に使用した。各突然変異体の発現レベルを追跡するために、トランスフェクションした 2.5×10^5 個のCOS-7細胞を35mmのプレートに再接種し、トランスフェクションの48時間後、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで4時間代謝標識した。上澄液を、抗ヒトIL-6R α モノクローナル抗体I6R1/9.G11で免疫沈降させた。次に免疫沈降した物質をSDSを含有するポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分析した。

突然変異体のIL-6結合解析

調整COS細胞培養培地中に含有されるsIL-6R α 突然変異体のIL-6に対する親和性を測定するために、我々が産生させた蛋白中の6つのヒスチジンの「尾」を使用した。

あらかじめ力価測定実験で測定し、イミダゾールを最終濃度5mMになるように加えた、トランスフェクションしたCOS細胞上澄液の適当な量を、20～40pMの ^{125}I -IL-6、および上昇する濃度の非標識サイトカインと混合した。平衡条件下で40 μl のNi $^{2+}$ -NTA-アガロース（キアゲン（Quiagen））（ヒスチジンの「尾」を持つ蛋白に選択的に結合することができる樹脂）を加え、さらに1時間インキュベートを続けた。こうして受容体により結合されたりガンドを間接的に樹脂に結合させ、PBS中30%ショ糖のクッションを介して遠心分離して遊離リガンド（上澄液）から分離した。すべての工程は4℃で行なった。遊離cpmと結合cpm（1秒当たりの放射能カウント）の値から、競合排除曲線を引いた。結果のスキャチャード（Scatchard）変換により、種々の可溶性IL-6受容体の見かけのKdを決定した（スポレノ、パオネッサ、サルバチ、グラジアニ、デルマストロ、シリベルト、およびトニアッチ（Sporeno, Paonessa, Salvati, Graziani, Delmastro, Ciliberto and Toniatti）（1994）J. Biol. Chem. 269, 10991-10995を参照）。マッキントッシュコンピュータで「ウルトラフィット（UltraFit）」ソフトウェア（バイオソフト（Biosoft）（登録商標））を用いて、結合データの解析と曲線当てはめを行った。

表1から明らかなように、結合親和性は：1) 突然変異体Asn230Asp (配列番号：1)、Asn230Asp/Ala228Asp (配列番号：2) について実質的に同じであり；b) His280Ser/Asp281Val (配列番号：3) については、わずかではあるが再現性を以って ($2.5 \text{ nM} \sim 6 \text{ nM}$) 低下し；そしてc) Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val (配列番号：4) については、野性型の活性が十分に保持された。

表1

ヒスチジンで標識しCOS細胞で発現した可溶性インターロイキン6受容体 (野性型および突然変異型) のIL-6結合親和性

突然変異体	IL-6結合親和性	nM
Asn230Asp	(配列番号：1)	1.5 ± 1
Ala228Asp/Asn230Asp	(配列番号：2)	2.0 ± 1
His280Ser/Asp281Val	(配列番号：3)	4.3 ± 2
Ala228Asp/Asn230Asp/ His280Ser/Asp281Val	(配列番号：4)	2.5 ± 1
wild type sIL-6R α		2.0 ± 1

gp130への突然変異体の結合

sIL-6R α /sgp130ヘテロダイマーのIL-6依存性の生成は、適当なモノクローナル抗体を使用して、インビトロで共免疫沈降法により容易に追跡できる。こうして野性型と同じ程度のIL-6結合親和性を示す突然変異体を選択し、それらのsgp130への結合をIL-6の存在下で共免疫沈降法により評価した。

^{32}S -標識sgp130を ^{125}I -IL-6 (免疫沈降法の内部標準として) とトランスフェクションしたCOS-7細胞培養培地 (未変性又は突然変異受容体のいずれかを含有する) の一部とインキュベートした。インビトロで結合させた後、混合物に抗IL-6R α モノクローナル抗体I6/R19.G11を加え、免疫沈降物をSDS-PAGEで分析した。結果を図1に示す。明らかなように、

突然変異体His280Ser/Asp281Val (配列番号: 3) は、IL-6/sIL-6R α 複合体sgp130分子の会合を強く低下させた (レーン4)。また単一置換体Asn230Asp (配列番号: 1) のsgp130との相互作用は低下した (レーン2)。sgp130との相互作用へのこの突然変異体の作用は、突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp (配列番号: 2) と同程度であった。最後に、4重突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val (配列番号: 4) は、³⁵S-sgp130を共免疫沈降する能力は最低であった (レーン5)。

受容体突然変異体をまた、細胞表面上のgp130と相互作用する能力について試験した。この目的のために、IL-6R α に比べてgp130分子を過剰に有するヒト黒色腫A375細胞で結合実験を行なった。実際A375単一層への¹²⁵I-IL-6の結合は、可溶性受容体により強く増強された。この現象は、sIL-6R α が¹²⁵I-IL-6に結合し、次に細胞の表面上に存在するgp130分子と相互作用する能力による。この相互作用の特異性は、sIL-6R α の存在下で¹²⁵I-IL-6の上昇した結合は、過剰の未標識ヒトオンコスタチン (Oncostatin) M (OM) の添加により競合されるという事実により証明される (図2)。このサイトカインは、直接gp130に結合することができ、IL-6/IL-6R α 複合体の結合についてgp130と競合することができる。野性型shIL-6R α と異なり、細胞を [¹²⁵I-IL-6 + アンタゴニストとして作用する可能性突然変異受容体] を投与した時特異的結合がわずかに増加したのみである (図2)。gp130との相互作用に対する最大の妨害は、His280Ser/Asp281Val (配列番号: 3) およびAla228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val (配列番号: 4) により示される。

突然変異体Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val (配列番号: 4) がIL-6アンタゴニストであることの証明

前記の結果は、この突然変異体が、IL-6への親和性を低下させることなく、gp130に対し最大の結合を有することを示している。この突然変異体の生物

学的活性を検討するために、その生産と野性型可溶性受容体の生産を、マックスバック (MaxBac) (登録商標) 系 (インビトロゲン (Invitrogen) のバキュロウイルス発現系) を使用してスケールアップを行った。発現し精製した受容体を免疫沈降実験で試験した。

グレース (Grace) の昆虫培地で増殖させた Sf9 細胞を用いて、トランスファクターのトランスフェクション、組換えウイルスの単離そして高力価ウイルスのストックの調製のために使用した。蛋白の産生のためにハイファイブ (HighFive) (登録商標) 細胞 (インビトロゲン (Invitrogen)) を使用した。簡単に述べると、グレース (Grace) の昆虫培地で増殖させた 4×10^7 のハイファイブ (High Five) 細胞を 750 ml のフラスコに接種し、感染多重度 (MOI) 10 で適当な組換えウイルスで感染させた。2 時間後細胞を洗浄し、SF-900 無血清培地を加えた。感染 36 時間後、培養上澄液を集め、PBS に対して透析し、 Ni^{2+} -NTA-アガロースカラムに直接適用した。PBS/8 mM イミダゾールで洗浄後、野性型 sIL-6R α と突然変異体の両方を PBS/80 mM イミダゾールで溶出した。精製した蛋白を PBS に対して透析し、直接使用するか又は 3 週まで 4 °C で保存した。

精製した蛋白の使用することにより、受容体の量を定量し、野性型受容体と突然変異受容体について広範囲の IL-6 濃度の存在下で gp130 と相互作用する能力を比較することができた。その結果 (図 3) は、COS 細胞誘導受容体であらかじめ得られた結果とよく一致した。興味深いことに曲線の各点で、共免疫沈降した gp130 の量は、野性型受容体より突然変異受容体で低く、試験したサイトカインの最高濃度 (100 nM) の場合でもこれは同じであった。これらの知見は、IL-6 と突然変異 sIL-6R α が gp130 に対して低親和性で複合体を形成することを追認している。

IL-6 活性に対する突然変異体の拮抗作用の可能性を試験するために、我々はヒト肝癌細胞中の転写因子 APRF (急性相応答因子) / STAT3 の IL-6 依存性活性化を選択した。チロシンリン酸化に依存する APRF の活性化は、迅速な細胞性事象であり、これは IL-6 ファミリーのすべてのサイトカインで刺激後数分以内に起きる。

ヒトHepG2細胞を、一定量の野性型受容体および突然変異受容体（100 nM）とともに増加する濃度のIL-6で刺激した。図4に示すように、shIL-6R α はIL-6によりAPRF誘導体を増強した（図4のレーン2～4と5～7を比較されたい）が、可溶性突然変異受容体はアゴニスト活性を欠くのみでなく、サイトカインの活性化をダウン修飾（down-modulate）した（図4、レーン8～10）。共免疫沈降実験から予測されるように、細胞を20 pMまでのIL-6で処理した時（レーン8と9、図4）阻害は完全であり、最大濃度のIL-6ではほんのわずかに誘導が検出された（200 pM、図4のレーン10）。

拮抗作用がIL-6に特異的であるか否かを試験するために、IL-6関連サイトカインOM（これもAPRFリン酸化を効率的に誘導することが知られている）で誘導したHepG2細胞に突然変異体を加えた。図5に示すように、突然変異体は、OM活性に拮抗しなかった。

配列表

一般情報:

(i) 出願人: インスチット・ジ・リセルシェ・ジ・ビオロジア・モレコラレ・
ピー・アンゲレッチ社 (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare P.
Angeletti S.p.A.)

(ii) 発明の名称: gp130 結合界面で突然変異したインターロイキン-6
(IL-6) 受容体 α の可溶性型よりなる IL-6 アンタゴニスト

(iii) 配列の数: 4

(iv) 連絡住所:

(A) 宛名: ソシエタ、イタリアーナ、ブレベッチ (Societa Italiana
Brevetti)

(B) 通り: ピアッツア・ジ・ピエトラ (Piazza di Pietra)、39

(C) 市: ローマ

(D) 国: イタリア

(F) 郵便番号: I-00186

(v) コンピューターで読める形式:

(A) 媒体の型: フロッピーディスク 3.5"、1.44メガバイト

(B) コンピューター: IBM PCコンパチブル

(C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS Rev
6.22

(D) ソフトウェア: マイクロソフト・ワード6.0

(viii) 弁理士/代理人情報:

(A) 氏名: ジ・セルボ・マリオ (博士)

(C) 参照/整理番号: RM/X88470/PC-DC

(ix) 電話連絡先情報:

(A) 電話: 06/6785941

(B) ファックス: 06/6794692

(C) テレックス: 612287 ロバート (ROPAT)

(1) 配列番号: 1の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: 蛋白

(iii) ハイボセティカル配列: なし

(v) フラグメント型: 中間部

(vii) 起源:

(A) 合成: 真核生物細胞中で組換え蛋白として産生

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/記号: A s n 2 3 0 A s p

(C) 同定方法: 変性 SDS / ポリアクリルアミドゲルの電気泳動

(D) 他の情報: 222 位から 236 位までのインターロイキン 6 受容体の
突然変異体型のアミノ酸配列

(xi) 配列: 配列番号: 1:

Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Ala	Arg	Asp	Pro	Arg	Trp	Leu	Ser	Val
1				5					10				15	

(2) 配列番号: 2 の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 15 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: 蛋白

(iii) ハイボセティカル配列: なし

(v) フラグメント型: 中間部

(vii) 起源:

(A) 合成: 真核生物細胞中で組換え蛋白として産生

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/記号: Ala 228 Asp / Asn 230 Asp

(C) 同定方法: 変性SDS/ポリアクリルアミドゲルの電気泳動

(D) 他の情報: 222位から236位までのインターロイキン6受容体の
突然変異体型のアミノ酸配列

(xi) 配列: 配列番号: 2:

Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Val	Asp	Arg	Asp	Pro	Arg	Trp	Leu	Ser	Val
1				5					10				15	

(1) 配列番号: 3の情報:

(i) 配列の特色:

(A) 長さ: 15アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の型: 蛋白

(iii) ハイポセティカル配列: なし

(v) フラグメント型: 中間部

(vii) 起源:

(A) 合成: 真核生物細胞中で組換え蛋白として産生

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/記号: His 280 Ser / Asp 281 Val

(C) 同定方法: 変性SDS/ポリアクリルアミドゲルの電気泳動

(D) 他の情報: 273位から287位までのインターロイキン6受容体の
突然変異体型のアミノ酸配列

(xi) 配列: 配列番号: 3:

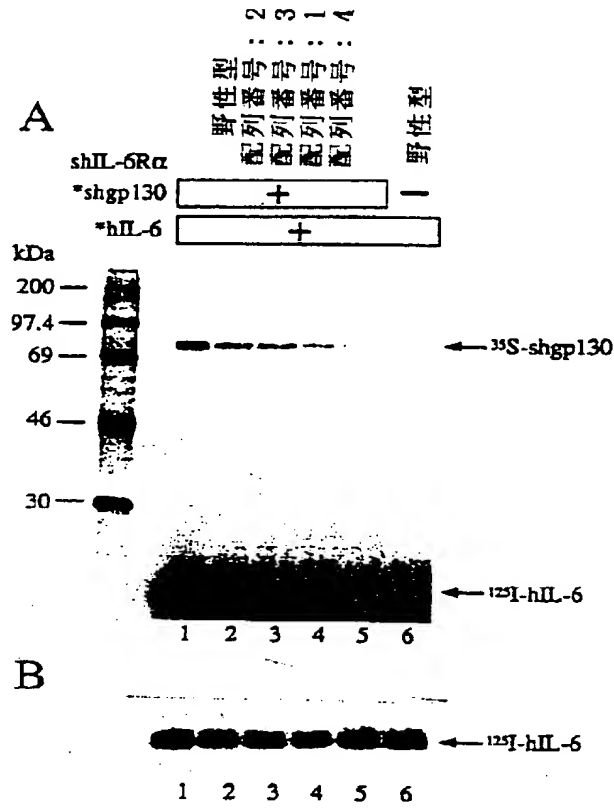
Leu	Gln	His	His	Cys	Val	Ile	Ser	Val	Ala	Trp	Ser	Gly	Leu	Arg
1				5					10				15	

(1) 配列番号: 4の情報:

(i) 配列の特色:

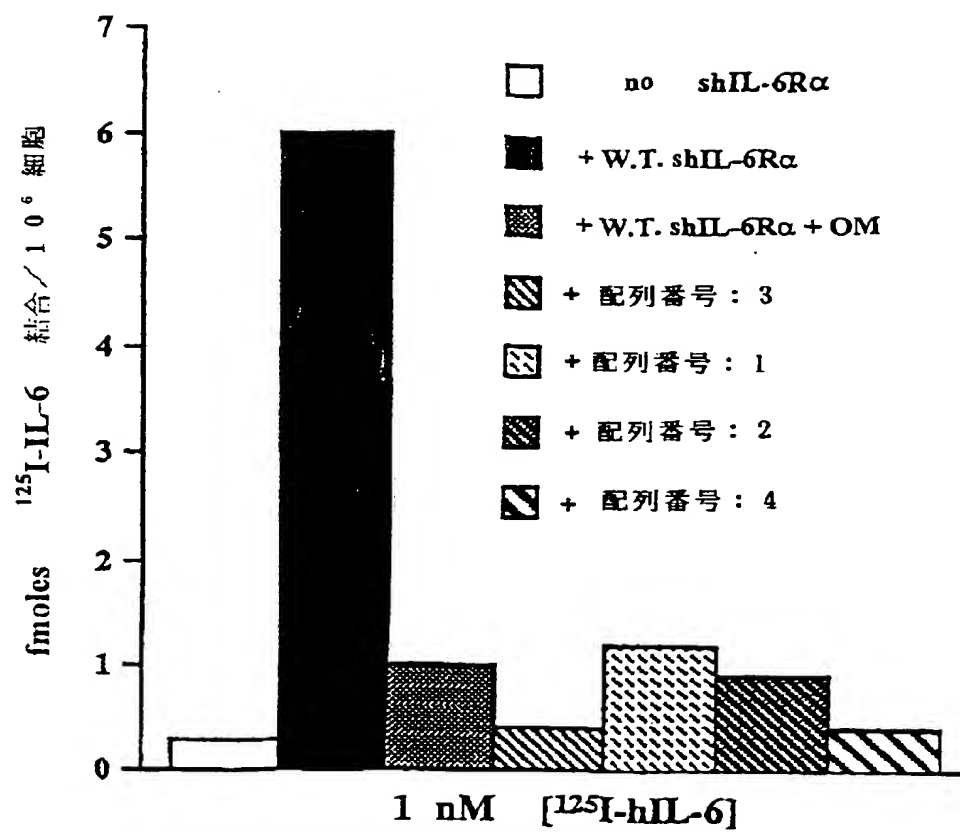
- (A) 長さ：66アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 分子の型：蛋白
 (iii) ハイボセティカル配列：なし
 (v) フラグメント型：中間部
 (vii) 起源：
- (A) 合成：真核生物細胞中で組換え蛋白として産生
- (ix) 配列の特徴：
- (A) 名称／記号：Ala²²⁸Asp／Asn²³⁰Asp／His²⁸⁰Ser／Asp²⁸¹Val
 (C) 同定方法：変性SDS／ポリアクリルアミドゲルの電気泳動
 (D) 他の情報：222位から287位までのインターロイキン6受容体の突然変異体型のアミノ酸配列
- (xi) 配列：配列番号：4
- | |
|--|
| Ile Thr Val Thr Ala Val Asp Arg Asp Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr |
| 1 5 10 15 |
| Trp Gln Asp Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe |
| 20 25 30 |
| Glu Leu Arg Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met |
| 35 40 45 |
| Val Lys Asp Leu Gln His His Cys Val Ile Ser Val Ala Trp Ser Gly |
| 50 55 60 |
| Leu Arg |
| 65 |

【图1】



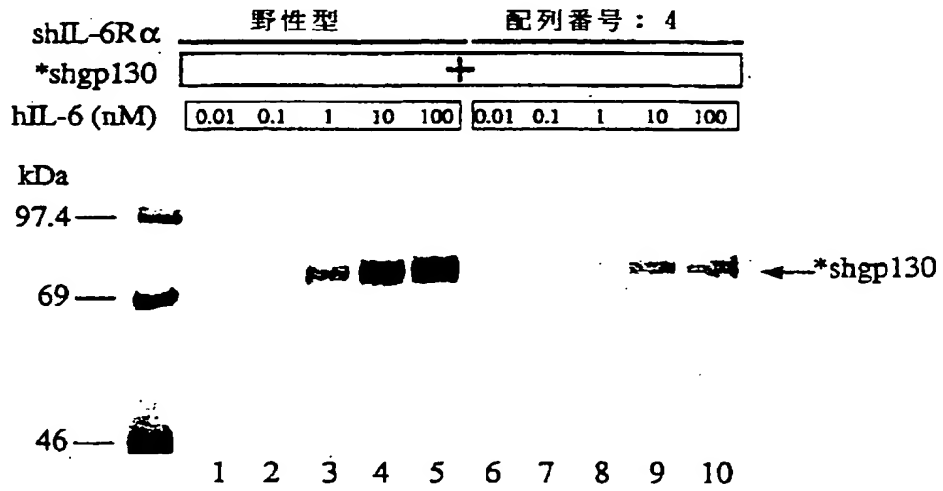
第 1 图

【図2】



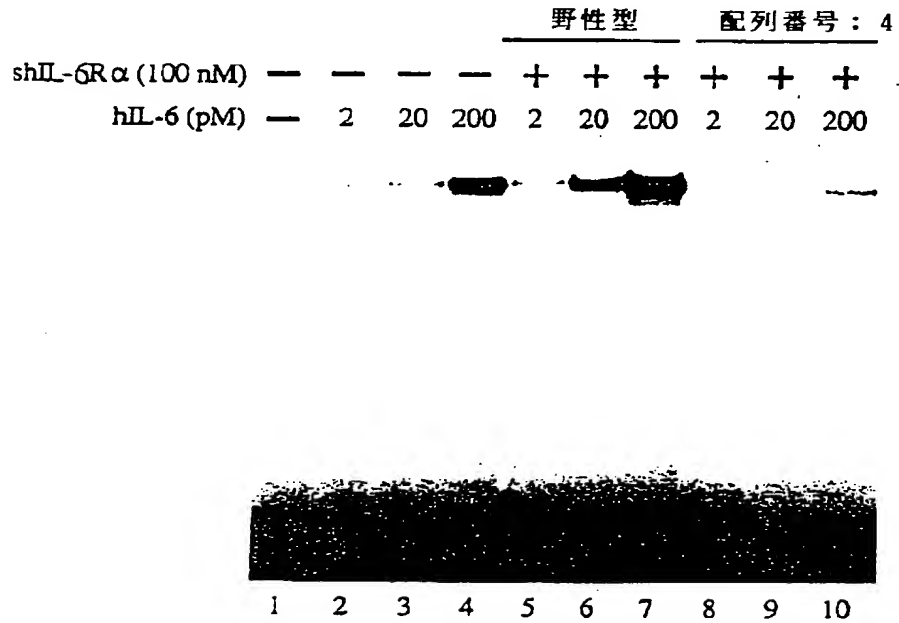
第 2 図

【図3】



第 3 図

【図4】


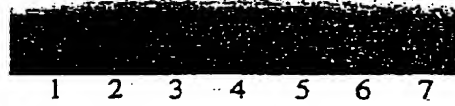


第 4 図

【图5】

shIL-6R α (100 nM)	—	—	—	—	—	—	—
hIL-6 (200 pM)	—	+	+	+	—	—	—
hOM (200 pM)	—	—	—	—	+	+	+

野性型 配列番号：4
 野性型 配列番号：4

第 5 图

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PL/IT 95/00208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K14/715

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EMBO J., vol. 12, no. 4, 1993, pages 1705-1712, XP002003859 YAWATA ET AL.: "Structure-function analysis of human IL-6 receptor : dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and IL-6 signal transduction through gp130" see page 1708 - page 1711 --- -/--	1,2,5,7, 8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- * "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- * "E" earlier document but published on or after the international filing date
- * "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- * "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- * "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- * "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- * "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- * "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- * "A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 May 1996

Date of mailing of the international search report

07.06.96

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentean 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3015

Authorized officer

Gac. G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC/IT 95/00208

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Week 9320 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 93-161739 XP002003861 & JP,A,05 091 892 (CHUGAI PHARM CO LTD & AL), 16 April 1993 see abstract & DATABASE STRAND TPSD AN: E52907, see in "mutation" list.</p>	1,2,5,7
P,X	<p>JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 270, no. 20, 19 May 1995, pages 12242-12249, XP000566420 SALVATI ET AL.: "Interleukin-6 (IL-6) antagonism by soluble IL-6 receptor alpha mutated in the predicted gp130-binding interface" see the whole document</p>	1-8
A	<p>COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY, vol. 54, 1989, pages 713-722, XP002003860 TAGA ET AL.: "Interleukin-6 receptor and a unique mechanism of its signal transduction" see the whole document</p>	1,7,8
A	<p>EUR. CYTOKINE NETWORK, vol. 5, no. 3, May 1994 - June 1994, pages 293-300, XP000571448 LIAUTARD ET AL.: "Epitope analysis of human IL-6 receptor gp80 molecule with monoclonal antibodies" see the whole document</p>	1,7,8

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	
C 1 2 P 21/02		9162-4B	C 1 2 N 15/00	A
(C 1 2 P 21/02				
C 1 2 R 1:91)				